

SECCION DE FARMACOLOGIA. EMPRESA DE LABORATORIO FARMACEUTICO "MARIO MUÑOZ". VICEMINISTERIO DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA. MINISTERIO DE SALUD PUBLICA. CIUDAD DE LA HABANA

Estudio experimental y clínico del efecto pigmentante epidérmico del extracto placentario humano*

Por:

Dr. CARLOS MIYARES CAO**, Dr. MANUEL TABOAS***, Ing. JESUS GARCIA****
y Dra. ELENA GONZALEZ*****

Miyares Cao, C. y otros. *Estudio experimental y clínico del efecto pigmentante epidérmico del extracto placentario humano*. Rev Cub Med 20(6) :530-538, nov-dic 1981

Se demuestra que la aplicación tópica de un extracto hidroalcohólico de placenta humana al 50% (p X v) sobre la piel del pezón y la areola de curíeles produce hiperpigmentación por aumento de la síntesis local de melanina; conjuntamente se confirma la utilidad de dicho extracto como recurso terapéutico en el vitíligo, mediante un estudio clínico realizado durante cuatro años, en el cual, de 200 pacientes tratados tópicamente, se obtuvo repigmentación total o parcial en 168, lo cual confiere al producto una eficacia del 84%.

INTRODUCCION

La placenta es un órgano rico en múltiples sustancias con diferentes actividades biológicas.

Desde hace muchos años es conocida la obtención de extractos placentarios y su utilización con fines terapéuticos y cosméticos.

* Trabajo presentado en el I Congreso Nacional de Dermatología. Junio de 1979.

** Médico farmacólogo. Jefe de la sección de farmacología. Empresa Laboratorio Farmacéutico "Mario Muñoz".

*** Médico dermatólogo Hospital docente "General Calixto García".

**** Ingeniero Industrial. Jefe del departamento Empresa Laboratorio farmacéutico "Mario Muñoz".

***** Médico Patólogo. Hospital docente "General Calixto García".

La composición exacta de los principios activos de muchos de estos extractos aún se desconoce, a pesar de que se han determinado muchas de sus propiedades fisicoquímicas.

No obstante, mediante el uso de pruebas biológicas y resultados terapéuticos experimentales se han demostrado, entre otras: acciones citopoyéticas, corticostimulantes, cicatrizantes, anabólicas y antiinflamatorias.¹⁻¹²

En 1976, *Miyares y colaboradores*¹³ informaron por primera vez en Cuba y, al parecer en el mundo, el empleo exitoso de un extracto placentario humano en solución hidroalcohólica al 33% (p x v) administrado en el tratamiento del vitíligo, afección dérmica caracterizada por áreas de despigmentación rodeadas por pigmentación normal o aumentada, que se localizan, principalmente, en la cara y regiones articulares, pero que pueden extenderse progresivamente por todo

el cuerpo, y cuyo origen permanece en discusión (*Andrews y Kerdel-Vega, 1961*).¹⁴

Los positivos resultados obtenidos en breve tiempo y con ausencia de reacciones secundarias nos estimularon a realizar un estudio más amplio del efecto pigmentante demostrado por dicho extracto placentario, utilizándolo a mayor concentración (50%) para acelerar sus efectos, así como fraccionarlos en distintos solventes con el objetivo de lograr identificar químicamente la sustancia (o sustancias) responsable de su acción, la cual constituya en un futuro inmediato un nuevo recurso terapéutico.

En el presente trabajo exponemos un resumen del estado actual y perspectiva de dicha investigación.

MATERIAL Y METODO

A. *Confección del extracto placentario humano al 50%*

Se toman 100 kg de placenta humana congelada, se limpian manualmente y se les separan el cordón umbilical y la mayor parte de las membranas.

Los cotiledones, descongelados se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de sangre y se molieron en molinos de carne del tipo disco y cuchilla.

Los cotiledones molidos se mezclaron con etanol (95%) en la proporción adecuada, y fueron sometidos a extracción bajo agitación a temperatura ambiente, durante 1 hora.

La masa de cotiledones se separó por filtración mediante gasa, y el líquido turbio obtenido se dejó sedimentar 24 horas.

Transcurrido ese lapso, se clarificó en filtro prensa el sobrenadante y se envasó a razón de 200 ml en frascos ámbar de vidrio o plástico rotulados externamente con las siglas: EP-50.

B. *Fraccionamiento del EP-50*

Con el propósito de identificar la sustancia responsable de la acción repig-

mentante dérmica se procedió a someter el extracto hidroalcohólico al 50% de placenta humana (EP-50) a un proceso de desecación en rotoevaporador BUCHI de 20 litros de capacidad y un horno de vacío a temperatura no mayor de 50°C.

El producto sólido así obtenido fue denominado M-0 y el mismo contenía el 81,75% de sólidos totales con el 0,51% de nitrógeno en base seca.

El fraccionamiento ulterior de M-0, siguiendo los principios de la técnica descrita por *Black y colaboradores (1956)*¹⁵ dio lugar a fracciones solubles e insolubles en acetona, alcohol, benceno y agua, así como saponificables e insaponificables a partir de los extractos cetónicos, las cuales fueron sometidas a los correspondientes estudios bioquímicos y farmacológicos.

Mediante la mezcla de las fracciones aisladas se trató de reconstituir el EP-50 para comprobar mediante los ensayos biológicos si la sustancia activa era volátil o no, en cuyo caso este extracto reconstituido carecería de efecto pigmentante.

Estudio farmacológico

Se comprobó la acción estimulante de la pigmentación melánica en curíeles según la técnica descrita por *Wheeler y colaboradores, 1953*.¹⁶

Se utilizaron curíeles machos inmaduros sexualmente de 125-275 g de peso, a los cuales se les aplicó tópicamente en forma de gotas el extracto placentario o sus fracciones sobre la areola y pezón derechos, dos veces al día en dosis de 20 gotas en cada aplicación.

A manera de control se aplican de igual forma 20 gotas del vehículo del extracto, etanol al 95% sobre la areola y pezón izquierdos.

Transcurrido el tiempo en que se observaron macroscópicamente signos de hipertrofia e hiperpigmentación, los animales fueron fotografiados y, posteriormente, sacrificados; se enviaron ambos pezones conservados en solución de formaldehído al 10% al servicio de anato

mía patológica del hospital docente "General Calixto García", donde fueron procesados para examen microscópico según la técnica histológica de hematoxilina-eosina.

C. *Estudios bioquímicos*

Se expusieron directamente a la luz solar y radiación ultravioleta mediante una lámpara "Original Hanau", tipo 406 AC (fluotest) (254 mm) durante 60 minutos en el interior de tubos de ensayo de 5 ml de capacidad: 2 ml de EP-50; etanol (95%) y L-Dopa (2 mg x ml en solución acuosa) por separado y mezclados a volúmenes iguales.

Para determinar los principales componentes bioquímicos del extracto placentario se utilizó cromatografía en capa delgada monodimensional y bidimensional ascendente en sílica gel G-60 esparcida sobre placas de vidrio (20 x 20 cm) en capas de 0,3 mm de espesor mediante un repartidor "Camag" en los siguientes sistemas de solventes:

Cloroformo: metanol: agua (65:25:5)

Hexano: dietil-éter: ácido acético: (80: 20:1)

Butanol: ácido acético: agua (50:50:12 fase orgánica)

Se utilizaron como reveladores:

Solución etanólica de ácido fosfomolibdico al 10% o butanol-ninhidrina con calentamiento a 105°C durante 5 a 10 minutos.

Las determinaciones cuantitativas de aminoácidos se efectuaron en un auto-analizador "AAA-881-Mikrotechna"

D. *Estudio clínico*

Se seleccionaron aleatoriamente 200 pacientes de uno y otro sexos, de la consulta externa del hospital docente "General Calixto García" de Ciudad de la Habana, quienes presentaban lesiones típicas de vitiligo diseminadas o localizadas por el cuerpo, en distintos grados de extensión, cuyas edades oscilaban entre 2 y 64 años y que no se encontraban bajo ningún régimen terapéutico en

el momento de iniciar el presente ensayo clínico.

Los pacientes fueron instruidos acerca de la forma de aplicarse tópicamente con los dedos, tres veces al día, el extracto placentario humano, fabricado experimentalmente por la sección de opoterápicos de la empresa laboratorio farmacéutico "Mario Muñoz", bajo la denominación de EP-50; friccionarlos intensamente con los dedos sobre las áreas de piel afectadas por la despigmentación hasta hacerlas enrojecer; además, deben exponerse las mismas directamente al sol, durante 15 minutos una vez al día, inmediatamente después de aplicado el extracto en la forma descrita.

Todos los pacientes fueron informados del carácter experimental del medicamento que sería utilizado, quienes voluntariamente aceptaron someterse al tratamiento.

Una vez comenzado el mismo los pacientes objeto del experimento fueron examinados trimestralmente para comprobar su efectividad. A 10 de ellos se les realizó biopsia de las áreas afectadas por la enfermedad una vez repigmentadas con el empleo del EP-50 para identificar la presencia de melanina.

RESULTADOS

I. *Estudio bioquímico*

Influencia de la radiación solar y ultravioleta

El interior de los tubos de ensayo que contenían la mezcla en igual proporción de EP-50 y L-Dopa, adquirió una coloración pardo oscura inmediatamente después de transcurrido el tiempo de exposición a la luz solar y 24 horas después de la irradiación ultravioleta. No ocurrió lo mismo cuando se expusieron por separado, aunque la L-Dopa adquiere un ligero tinte rosado únicamente después de exponerse al sol.

Identificación cromatográfica

La fracción soluble en benceno constituye más del 43% del EP-50 desecado;

mientras que la fracción soluble en acetona, tanto saponificable como insaponificable se corresponde con más del 34%. La fracción soluble en acetona contiene colesterol y lípidos libres, predominando el colesterol en la porción insaponificable y los lípidos libres no identificados en la saponificable.

La fracción soluble en benceno contiene, a su vez, lecitina y otras manchas aún no identificadas.

La fracción soluble en alcohol contiene esfingomielina y otros fosfolípidos sin identificar, así como los siguientes aminoácidos: lisina, aspártico, treonina, serina, glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, tirosina y fenilalanina.

Las fracciones solubles e insolubles en agua sólo contienen sales minerales.

II. Estudio farmacológico

Se observó hipertrofia e hiperpigmentación de areola y pezón en los curielos tratados durante 51 días con EP-50 y durante 22 días con las fracciones solubles en acetona y el EP-50 y reconstituidos

a partir de sus distintas fracciones (figura 1).

El estudio hístico demostró gran acúmulo de pigmento melánico hacia las zonas centrales del pezón y la areola, disminuyendo en densidad y espesor hacia la periferia, pero ocupando siempre un área más extensa que en los controles (figuras 2 y 3).

La pigmentación es intensa y se encuentra regularmente distribuida, sobre todo en áreas de gran acúmulo de folículos pilosos, lo que no se observa en los controles, o en éstos se distribuye escasa e irregularmente.

III. Estudio clínico

Los resultados obtenidos en nuestro estudio se muestran en el cuadro.

El tiempo promedio en producirse la repigmentación total o parcial fue de 4 a 11 meses (mínimo: 3 meses; máximo: 31 meses).

Es conveniente destacar que los pacientes de raza negra repigmentan más rápidamente que los de raza blanca.



Figura 1. Vista de la región infrabdominal de un curiel donde puede observarse, en comparación con el lado izquierdo la hipertrofia e hiperpigmentación producidas en la areola y pezón derechos, luego de aplicarles durante 51 días 20 gotas de EP-50.

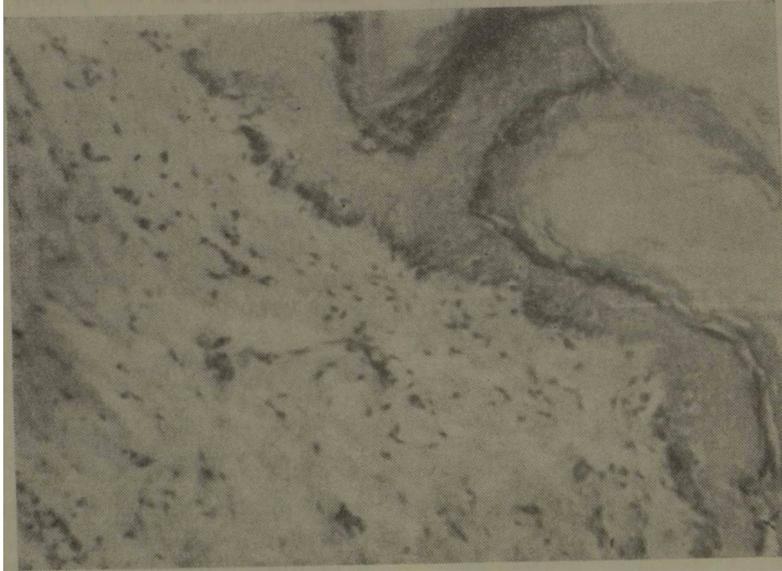


Figura 2. Corte histico del pezón y areola de un curiel no tratado con EP-50 donde se observa el depósito normal de lanina en la zona dérmica.

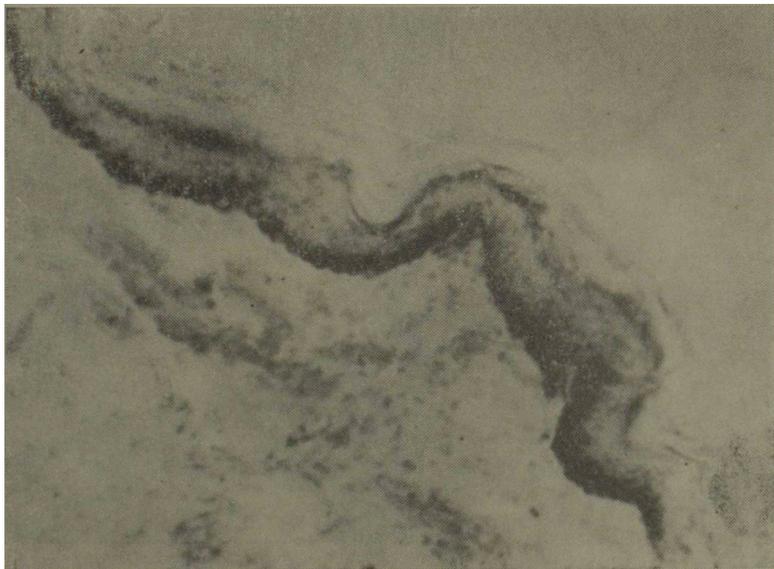


Figura 3. Corte histico del pezón y areola de un curiel tratado tópicamente con EP-50 durante 51 días, donde puede observarse notable aumento producido en el depósito melánico de la zona dérmica.

No se observaron reacciones secundarias locales o sistemáticas, a pesar de que varios pacientes han utilizado EP-50 tópicamente 3 veces al día durante 3 a 4 años, de forma continua sobre diferentes áreas corporales.

Una vez obtenida la repigmentación no se han producido recidivas en 1 a 2 años de observación continua; la repigmentación es del mismo aspecto que las

demás regiones del cuerpo que permanecían normales, por lo que el efecto parece ser permanente (figuras 4 a la 10).

En el estudio histórico de fragmentos de la piel obtenidos de áreas corporales humanas repigmentadas con EP-50, se demostró pigmentación melánica de la membrana basal en los 10 pacientes estudiados.

CUADRO
PACIENTES TRATADOS DURANTE 4 AÑOS Y 2 MESES (OCTUBRE, 1974-DICIEMBRE, 1978)

Efectos del tratamiento	Pacientes	%
Repigmentados	168	84
Totalmente	63	31,5
Parcialmente'	105	52,5
Sin repigmentar	5	2,5
Abandonaron tratamiento	27	13,5
Total que recibió tratamiento	200	100,0

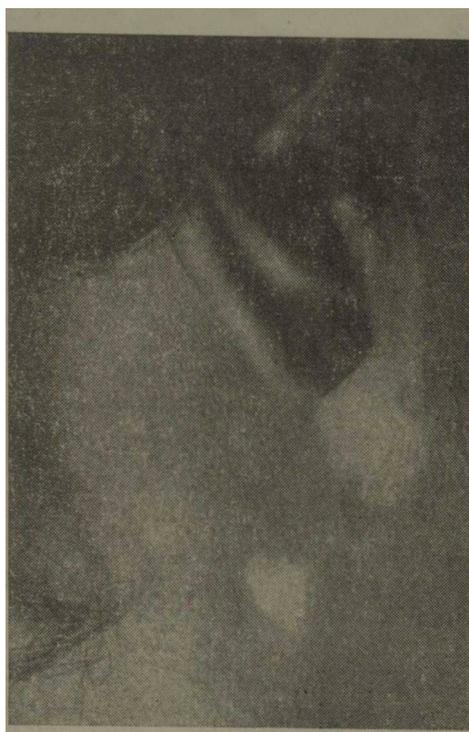


Figura 4. Pacientes con áreas de despigmentación cutánea por vitiligo en región auricular derecha antes de iniciar el tratamiento tópico con EP-50.

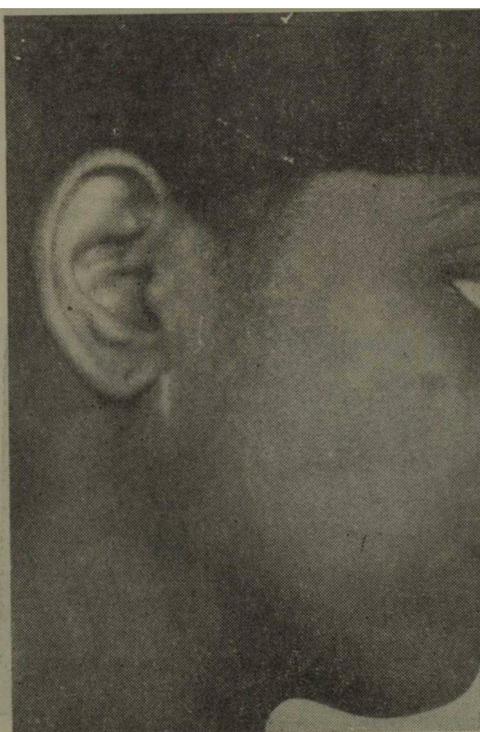


Figura 5. Repigmentación casi total de la paciente después de 6 meses de tratamiento con EP-50.

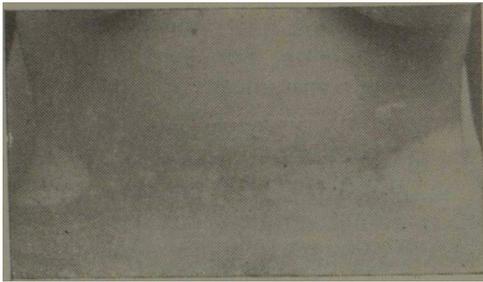


Figura 6. Paciente con áreas de despigmentación cutánea extensas por vitíligo en regiones laterales del tronco al inicio del tratamiento tópico con EP-50.

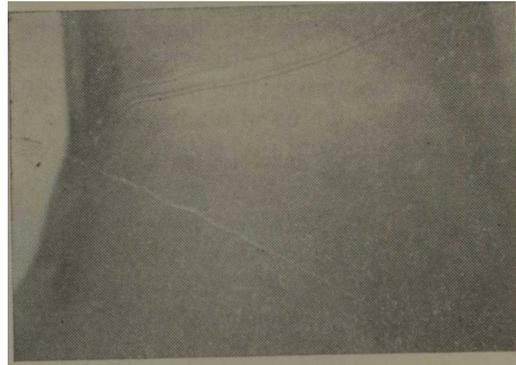


Figura 9. Repigmentación casi total de la paciente del caso anterior a los 8 meses de tratamiento.



Figura 7. Repigmentación total obtenida en la paciente de la figura anterior, después de 1 año de tratamiento.

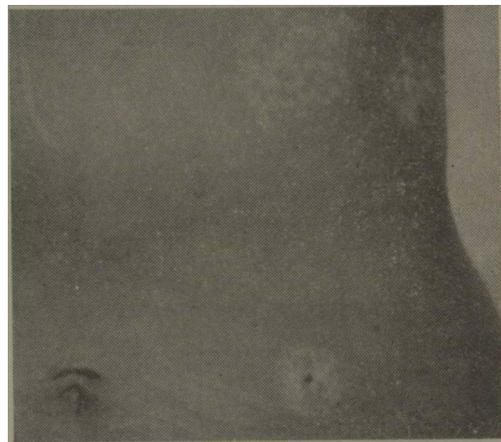


Figura 10. Aspectos de las áreas de vitíligo al iniciarse la repigmentación después de 26 días de tratamiento tópico con la EP-50. Obsérvense los numerosos puntos de pigmento recién formados con aspecto de "peças", que van coalesciendo hasta cubrir totalmente dichas áreas.

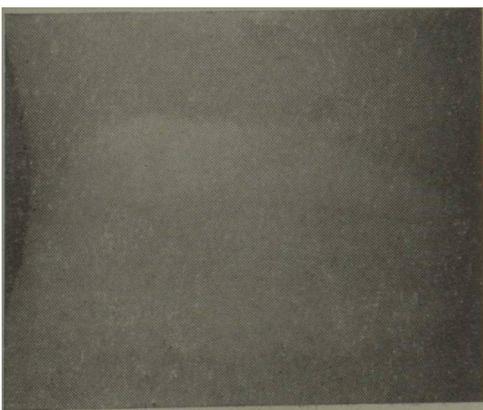


Figura 8. Extensa zona de despigmentación cutánea por vitíligo en región lateral derecha del tronco en una paciente al iniciar el tratamiento con EP-50.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos demuestran objetivamente que el extracto hidroalcohólico al 50% de placenta humana, posee acción estimulante de la síntesis de melanina y que dicha actividad por localizarse en su fracción soluble en acetona, puede ser atribuida a sustancias de tipo lípido.

Ya que no han sido todavía aisladas ni identificadas éstas a plenitud, es di-

fácil precisar su mecanismo de acción; sin embargo, el análisis de algunos datos experimentales nos permiten suponer que el mismo puede consistir en un efecto oxidante directo de la L-Dopa (dihidroxifenilalanina), presente en las áreas despigmentadas y que constituye una sustancia esencial en la síntesis de la melanina, previa oxidación y polimerización (Lerner y Fitzpatrick, 1950).¹⁷

Las soluciones de L-Dopa mezcladas con EP-50 a volúmenes iguales se ennegrecen después de exponerse durante 1 hora a la luz solar, formando melanina *in vitro*.

Conjuntamente algunos de los aminoácidos identificados en el extracto placentario pueden activar a la enzima tirosinasa, bajo la forma de *bioestimulinas* (Filatov, 1945);¹⁸ (Chikalo, 1965);¹⁰ (Muchnik, 1957),¹⁹ quizás mediante el bloqueo de los compuestos con grupos sulfidrilos-inactivadores competitivos de dicha enzima-que según demostraron Van Scott y colaboradores (1953),²¹ abundan en las áreas de piel vitiliginosas.

Por último, no podemos olvidar la existencia conjunta de un aporte de sustancias precursoras de la melanina, como la tirosina y la fenilalanina, ambas identi-

ficadas en el estudio bioquímico del EP-50, las cuales servirán de sustrato a la enzima recién activada, produciéndose la regeneración del pigmento dérmico.

La efectividad e inocuidad demostradas por el producto experimental EP-50, fabricado en la sección de opoterápicos de la empresa laboratorio farmacéutico "Mario Muñoz", unidas al elevado número de pacientes afectados por vitíligo en el país, determinaron la decisión, de los responsables del Formulario Nacional (Ministerio de Salud Pública) de autorizar su producción industrial en calidad de nuevo recurso terapéutico, bajo la denominación de "melagemna". Su distribución se regula mediante receta médica obligatoria, expedida por servicios de dermatología, con lo que se contribuye al beneficio inmediato de estos enfermos, independientemente de continuar la búsqueda del principio activo pigmentante placentario, el cual suponemos llegue a constituir el tratamiento definitivo de esta afección.

Agradecimiento

Agradecemos la colaboración brindada por los compañeros Humberto López, María Arbesú, Nancy Cabrera, Sofía Roque y Luis R. Alvarez.

SUMMARY

Miyares Cao, C. et al. *Experimental and clinical study on epidermic pigmental effect of human placental extract*. Rev Cub Med 20: 6, 1981.

It is demonstrated that topic application of a hydroalcoholic extract of human placenta 50% (p x v) over the skin of nipple and areola of the Guinea pigs result in hyperpigmentation by increasing of melanin local synthesis; in addition, usefulness of such extract as therapeutical means for vitiligo is verified through a clinical study performed during four years. By this means, from 200 patients topically treated. total or partial repigmentation as obtained for 168 of them, giving the product 84% efficiency.

RÉSUMÉ

Miyares Cao, C. at al. *Etude expérimentale et clinique de l'effet de pigmentation épidermique de l'extrait placentaire humain*. Rev Cub Med 20: 6, 1981.

Il est démontré que l'application topique d'un extrait hydroalcoolique de placenta humain à 50% (p x v) sur la peau du mamelon et de l'aréole de cobayes produit une hyperpigmentation par augmentaron de la synthèse locale de mélanine; de même, il est confirmé l'utilité de cet extrait en tant que moyen thérapeutique dans le vitiligo, par une étude clinique réalisée pendant quatre années, dans laquelle sur 200 patients traités topiquement, 168 ont montré une repigmentation totale ou partielle, ce qui représente 84% d'efficacité du produit.

PE3KME

i

Maflapec Kao, K. h ,np. 3KcnepaMeHTajiBHoe a wraim'ieckoe ac- cjeioBaHne smmepwmeckoro TmraeHTiipjnomero 3\$foeKTa luaueHTaE Horo qejioBe^tecKoro 3KCTpaKTa. Rev c«b žtec? 20- 6, t o 8 i.

B HacTOHnjeH pp.doTe nojpieKUBaeTCfl, HTO TomreecKoe npMMeHemie BojmocmtpTOBoro 3KCTpa.KTa 50% 'tejoBenecKofi ruiaueHTH (p x vO- na Kosy cocKa a apiojm KypaejieBoi BHSHBaeT rnnepnarMeHTauao b pe3yjiBTaTe noBHineHiiir MSCTHoro caHTe3a Me'jamiHH. OjmoBpeMeH ho, no^TBepxaeTCH nojie3HC>CTB yKa3aHHoro SKCTpaKTa Kan Tena- neBTH^ecKoro pecvnpa b ac^e3H0BeHaa kokhoú rrrrieHTanaa, noc- pejntcTBOM KJuuiuecKoro aocjieflOBaniiH, npoBojthBraeroch: b Te^eraa ^eTjpeX JieT, bo BpeMH noTopo y 200 nauaeHTOB, Jie'qawHX Tona qeckM, HaOjncniajjacB aojraaa penerr.iaHTaiaH iuia ^acTa^anj 1687 *ito yKa3UBaeT, ^ito npoijKT HBjiHeTCfl sixfieKTHBHMM na 84%.

BIBLIOGRAFIA

1. *Vachon, R.; J. Cotte.* Ann Dermatol 5: 585- 1951.
2. *Badinand, A. et al.* Comp Ren Soc Biol 147- CXLVII: 323, 1953.
3. *Bernard, Y.* LYON THESIS, 1950.
4. *Gate, J. et al.* Ann Dermatol 2: 288, 1950.
5. *Nakamura, T.* Comp Ren Soc Biol 104, 1930.
6. *Ichlansky, N. E.* REV PATH COMP 435-1389, 1932.
7. *Ichlansky, N. E.* MED PROGRESS 7-301, 1933.
8. *Binet, L.* COMM AC SCI 9-30, 1957.
9. *Román!, L.* COMP REND SOC BIOL 7-117, 1951.
10. *Vairel, E.; J. Choay.* THERAPY 4: 626, 1957.
11. *Ratsimamanga, A. R.* THERAPY 2: 46, 1958.
12. *Bureau, A. M.* AM PERFUMER AROMATICS 37: 40, 1960.
13. *Miyares, C.M. y otros.* Rev Cub Farm 10: 67, 1976.
14. *Andrews, G. C.; F. Kerdel-Vega.* Enfermedades de la piel. Reimpresión. Ed. Imp. Nac. Cuba, 1961.
15. *Black, R. J.* A manual of paper chromatogra- phy and paper electrophoresis. Ed. Ac Press, Inc., New York, USA, 1958.
16. *Wheeler, C. E. et al.* J Invest Dermatol 20: 385 1953.
17. *Lerner, A.B.; T.B. Fitzpatrick.* Biochemistry of Melanin formation. Physiol Rev 30: 41, 1950,
18. *Filatov, V.* Trasplante ocular de la córnea e histoterapia. Ed Medicina Menguis, 1945.
19. *Chikalo, I.* Influencia de la histoterapia sobre la actividad de los sistemas fermentativos. Trabajos de la Conf. Cientif. Conmemorativa 80 Aniversario del Nacimiento de Filatov. 155-170, Kiev, 1956.
20. *Muchnik, S.* Histoterapia. Folleto Inst. Invest. Cientif. Filatov. Ed Medexport, Moscú, URSS, 1975.
21. *Van Scott, E.S. et al.* J Invest Dermatol 20 (21): 1953.

Recibido: abril 4, 1980.

Aprobado: abril 23, 1980.

Dr. *Carlos Miyares Cao*

Hospital "Calixto García".

27 y J, Vedado.